

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Josipa Rukavina

ZADRŽAVANJE TVARI BOJE I AROME U SOKU ARONIJE TIJEKOM
KONCENTRIRANJA NANOFILTRACIJOM

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2016.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Proces i prehrambeno inženjerstvo**Tema rada** je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 22. travnja 2016.**Mentor:** doc. dr. sc. *Anita Pichler***Zadržavanje tvari boje i arome tijekom koncentriranja nanofiltracijom***Josipa Rukavina, 325-DI*

Sažetak: Aronija pripada skupini najzdravijeg bobičastog voća zahvaljujući svojoj nutritivnoj vrijednosti. Bogata je antioksidansima, dijetetskim vlaknima, fitonutrijentima, folnom kiselinom itd. Zbog oporog okusa većinom se prerađuje u razne prehrambene proizvode kao što su džemovi i sokovi. U ovom istraživanju sok aronije se koncentrirao postupkom membranske nanofiltracije pri tri različita tlaka (4,5 MPa, 5,0 MPa i 5,5 MPa) i dva temperaturna režima (uz hlađenje i bez hlađenja retentata). Maksimalan udio topivih čvrstih tvari je 26,9%. Aromatske komponente u početnom soku aronije i koncentratu identificirane su pomoću plinske kromatografije i masene spektrometrije. Protok permeata ovisan je o parametrima procesa. Najveći zabilježeni protok (19,43-9,61 L/m²h) dogodio se u procesu koncentriranja pri 5,5 MPa bez hlađenja. Najveće zadržavanje polifenola također je ostvareno pri istim parametrima, dok su se aromatski spojevi najviše zadržali pri tlaku od 5,5 MPa sa hlađenjem. Prikupljeni permeati su također analizirani. Imali su 1% čvrstih tvari i sadržavali su male količine fenolnih i aromatskih spojeva koji su prolazili kroz membrane.

Ključne riječi: nanofiltracija; aronija; protok permeata; antioksidacijska aktivnost; fenolne tvari; tvari arome**Rad sadrži:** 55 stranica
14 slika
4 tablica
0 priloga
70 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Anita Pichler</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> | Član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 11. srpnja 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technology
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Processes in Food Industry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 25, 2016.

Mentor: *Anita Pichler*, PhD, assistant prof.

Retention of colour and aroma compounds in aronia juice during nanofiltration concentration

Josipa Rukavina, 325-DI

Summary: Chokeberries are among the healthiest berries due to their high nutritional value. They are rich in antioxidants, dietary fibre, phytonutrients, folate, etc. Because of astringent taste they are usually processed to various food products like juices and jams. In the present study chokeberry juice was concentrated by nanofiltration membrane process at three different pressures (4,5 MPa, 5,0 MPa and 5,5 MPa) and two different temperature regime (with cooling and without cooling of the retentate). The maximum achievable total soluble solid content was 26,9%. The aromatic components in initial juice and concentrates were identified by gas chromatography mass spectrometry. The permeate flux highly depended upon processing parameters. The highest recorded (19,43-9,61 L/m²h) was in process at 5,5 MPa without cooling. The best retention of total phenolic was also observed in that process, while aromatic components mostly retained at 5,5 MPa with cooling. Also, collected permeates were analysed. They had 1% of total soluble solid content and contained some small amounts of phenolic and aromatic components that pass through membrane.

Key words: nanofiltration; chokeberry; permeate flux; antioxidant activity; phenolic compounds; aroma compounds

Thesis contains: 55 pages
14 figures
4 tables
0 supplements
70 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Mirela Kopjar</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Anita Pichler</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Lidija Jakobek</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Nela Nedić Tiban</i> PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: July 11, 2016

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Pichler na odvojenom vremenu i strpljenju te na stručnoj pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada. Također, zahvaljujem se svim svojim kolegama i kolegicama bez kojih ovaj cijeli tijek studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno. Na kraju, najveću zaslugu za ono što sam dosad postigla pripisujem svojim roditeljima i Stjepanu, bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ARONIJA	4
2.1.1. KEMIJSKI SASTAV ARONIJE.....	5
2.1.2. LJEKOVITOST ARONIJE	6
2.2. VOĆNI SOKOVI I KONCENTRATI	6
2.3. MEMBRANSKI PROCESI	8
2.3.1. PODJELA MEMBRANSKIH PROCESA	9
2.3.2. PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI	14
2.4. POLIFENOLI	15
2.4.1. PODJELA POLIFENOLA	15
2.4.2. ANTOCIJANINI	16
2.4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA.....	17
2.5. AROMA	18
2.5.1. TVARI AROME I VOĆA.....	18
2.5.2. AROMA ARONIJE.....	18
2.6. PLINSKA KROMATOGRAFIJA	19
2.6.1. MASENA SPEKTROMETRIJA	21
2.6.2. SPME ANALIZE	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. ZADATAK.....	24
3.2. MATERIJAL I METODE	24
3.2.1. PRIPREMA KONCENTRIRANOG SOKA ARONIJE	24
3.2.2. ANALIZA TVARI BOJE	26
3.2.3. ANALIZA TVARI AROME	29
4. REZULTATI.....	31
4.1. TABLIČNI I GRAFIČKI PRIKAZI ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA.....	32
5. RASPRAVA	37
6. ZAKLJUČCI	42
7. LITERATURA	44

Popis oznaka, kratica i simbola

SPME	Solid Phase Microextraction (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi)
GC	Plinska kromatografija
NF	Nanofiltracija
GC-MS	Plinska kromatografija sa masenim-selektivnim detektorom
PDMS	Polidimetilsiloksan
PA	Poliakrilat
DPPH	2,2-dimetil-1-pikrilhidrazil
AH	Antioksidans
R	Radikal
PC	Polimerne boje
MAC	Monomeric anthocyanin concentration (koncentracija monomera antocijanina)
TPC	Total polyphenol concentration (ukupna koncentracija polifenola)
TFC	Total flavonoid concentration (ukupna koncentracija flavonoida)
TSSC	Total soluble solids content (ukupan sadržaj topivih čvrstih tvari)
H	Uz hlađenje
BH	Bez hlađenja
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina)
FW	Fresh weight (svježa masa)

1.UVOD

Aronija (lat. *Aronia melanocarpa*; eng. Chokeberry) pripada skupini bobičastog voća. Njezina domovina je istočna obala Sjeverne Amerike, dok je u Europi kao voćna vrsta najraširenija u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza i Poljskoj. Zadnje desetljeće obilježeno je povećanim interesom za sok aronije zbog visokog sadržaja antocijana i flavonoida, koji je pet do deset puta veći nego kod drugih vrsta voća kao što su brusnica, acai, borovnica, crni ribiz i dr. Plodove aronije prerađujemo u sokove, pekmeze i kompote. Moguće ih je koristiti i kao svježe, ali i sušene, mljevene u čaj ili prah. Naravno, možemo ih i zamrznuti radi korištenja u hladnim zimskim danima kada organizmu nedostaje imuniteta. Upotrebljavaju se za pripremu osvježavajućih napitaka, kao dodatak mliječnim proizvodima - raznim namazima, jogurtima i sirevima. Iz bobica aronije pripremaju se izuzetno ukusni likeri, kao i rakija i vino. Izvrsna je kao dodatak čokoladi. Aronija je odličan izvor antioksidanasa i sprječava bolesti srca i krvnih žila, regulira krvni tlak, jača imunitet, povoljno djeluje na probavni sustav, pospješuje izlučivanje teških metala iz organizma. Nanofiltracija je tehnologija koja je u usponu proteklih nekoliko godina. To je tlačni membranski postupak koji se najviše upotrebljava za čišćenje vode u sustavima grijanja vode, ali se koristi i u proizvodnji hrane i pića, obradi vode i aplikacijama u visokokapacitetnim rashladnim tornjevima. Veličina pora membrana za nanofiltraciju (NF) je od 1 nm do 10 nm (1 - 150 μm), po tome je ovaj proces dobio naziv nanofiltracija. Membrane za nanofiltraciju su u načelu identične membranama za reverznu osmozu jer se proizvode od istih polimera i na isti način (uglavnom modul sa spiralnim namotajem) samo što je njihova veličina pora nešto veća. Membrane za nanofiltraciju, za razliku od RO, propuštaju manje anorganske i organske molekule (soli, organske kiseline i drugo) pa permeat nije čista voda kao kod RO. Potrebni tlak kod nanofiltracije je od 10 do 40 bara. Cilj provedenih pokusa je istražiti utjecaj nanofiltracije na zadržavanje tvari boje i arome soka aronije pri tlakovima od 50 i 55 bara, s i bez primjene hlađenja. Rezultati istraživanja pokazali su da je protok permeata ovisan o parametrima procesa. Najviša zabilježena protočnost (19,43-9,61 L/m²h) bila je u procesu pri 5,5 MPa bez hlađenja. Najbolje zadržavanje ukupnih fenola također je zabilježeno pri istim parametrima, dok su se aromatski spojevi najviše zadržali pri tlaku od 5,5 MPa sa hlađenjem.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Aronija

Crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa*) je višegodišnja listopadna voćna vrsta podrijetlom iz Sjeverne Amerike, a pripada porodici ruža (*Rosaceae*). Postoji nekoliko istoznačnica za crnoplodnu aroniju koje su u upotrebi, kao što su npr. *Aronia nigra*, *Aronia arbutifolia* var. *nigra*, *Sorbus melanocarpa*, *Pyrus melanocarpa*, *Photinia melanocarpa* i *Mespilus arbutifolia* var. *melanocarpa* (The PLANTS Database, database version 5.1.1., 2000.).

Tijekom godina aronija se svrstava u različite rodove, uključujući *Mespilus*, *Pyrus*, *Adenorachis*, *Sorbus* i *Photinia* prema različitim taksonomskim podjelama (Robertson i sur. 1991.). Rehder (1949) i Hardin (1973) svrstavaju je u rod *Aronia*. 1991 Robertson i sur. svrstavaju je u rod *Photinia*, navodeći da ne postoji razlika u morfologiji cvijeta i voća između biljaka u rodovima *Aronia* i *Photinia*. Tako, prema Roberson i sur. (1991), crvenoplodna aronija postaje *Photinia pyrifolia*, crnoplodna *Photinia melanocarpa* i ljubičastoplodna *Photinia floribunda*. Botaničar Cornelius Kalkman (2004) izražava sumnju da je morfologija između navedenih rodova ista, a novija molekularna istraživanja to i potvrđuju (Potter i sur., 2007.; Cambell i sur., 2007.). Prema njima svrstava je u rod *Aronia*. U **Tablici 1** dana je znanstvena klasifikacija crnoplodne aronije (The PLANTS Database, 2000.).

Tablica 1 Znanstvena klasifikacija crnoplodne aronije (The PLANTS Database, 2000.)

Carstvo	Plantae
Divizija	Tracheophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Podporodica	Amygdaloideae
Rod	<i>Aronia</i>
Vrsta	<i>Aronia melanocarpa</i>

Smatra se da postoje četiri vrste unutar roda *Aronia*:

- crvenoplodna aronija (*Aronia arbutifolia*),
- crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa*),
- ljubičastoplodna aronija (*Aronia prunifolia*) koja je hibrid dvije prethodno navedene i
- *Aronia mitschurinii* koja je nastala uzgojem (također je poznata i kao *Sorbaronia mitschurinii*).

Divlja aronija se razlikuje od kultiviranih sorti koje se danas uzgajaju u komercijalne svrhe. Komercijalno značajni kultivari koji se uzgajaju u Europi i SAD-u su Nero, Rubina, Viking, Hugin, Galicjanka, Hakkija, Ahonnen, Kurkumacki, Serina, Morton i McKenzie (Jeppson, 2000.). Novija istraživanja ukazuju da su kultivari Nero, Viking i McKenzie, razvijeni u istočnoj Europi, hibridi crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa*) i jarebike (*Sorbus acuparia*). Također, vrlo je mala genetička različitost između pojedinih kultivara; Nero, Viking i Galicjanka su gotovo identični kada se uspoređuju preko genetičkih markera (Smolik i sur., 2011.).

2.1.1. Kemijski sastav aronije

Plod aronije ima niske udjele kalorija i masti, ali je bogat vitaminima, mineralima, antioksidansima i prehrambenim vlaknima. Kemijski sastav uvelike ovisi o cijelom nizu čimbenika kao što su kultivar, način gnojidbe, zrelost bobica, datum berbe, lokacija nasada i dr. (Jeppson i sur., 2000.; Skupien i sur., 2007.). Visok sadržaj sorbitola i polifenola razlikuju plodove i sok aronije od drugog bobičastog voća (Ara, 2002.).

Cijeđenjem svježeg ploda aronije može se dobiti oko 75 – 80% soka, što se može i povećati za 6%, ako se plodovi prije cijeđenja smrznu neko vrijeme na – 5 °C (Milić, 2012.). Također se pokazalo dobrim, u smislu povećanja prinosa i očuvanja polifenolnih sastojaka, provođenje maceracije uz toplinsku obradu (50 °C; 90 minuta) i dodatak enzimskih preparata (različite pektinaze) prije prešanja (Borowska i sur., 2009.).

2.1.2. Ljekovitost aronije

Aronija spada u voće s najbogatijim sadržajem biljnih fenola, a taj visok udio, kao i sastav pojedinih fenolnih sastojaka, zaslužen je za široki raspon potencijalnih medicinskih i terapijskih učinaka. Koristi se za regulaciju krvnog tlaka i spriječavanje kardiovaskularnih bolesti (Kulling i Rawel, 2008.; Skoczynska i sur., 2007.), održavanje elastičnosti krvnih žila, ima zaštitni učinak na jetru (Valcheva-Kuzmanova i sur. 2004.), osnažuje tijelo u borbi protiv bakterija i virusa, održava zdravlje mokraćnog sustava. Aronija regulira pravilan rad i izlučivanje hormona štitne žlijezde, regulira rad pankreasa pa može biti korisna u liječenju dijabetesa (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2007.; Simeonov i sur., 2002.). Plod je bogat i vitaminom P iz skupine B-B9, što utječe na normalizaciju zgrušavanja krvi (Milić, 2012.).

2.2. VOĆNI SOKOVI I KONCENTRATI

Voćni sokovi su polidisperzni sustavi koji se međusobno razlikuju po veličini čestica voćnog tkiva i njihovoj topljivosti u vodi. Većinom sadrže oko 11% topljive suhe tvari određene refraktometrijski (Levaj, 2013.).

Oni kao proizvodi podliježu određenoj zakonskoj regulativi i to "Pravilniku o voćnim sokovima i nektarima te njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju " (NN 2009/02). Prema Pravilniku voćni sok je proizvod koji nije fermentirao, ali može fermentirati, a proizvodi se od jedne ili više vrsta tehnološki zrelog, svježeg ili ohlađenog voća. Boja, aroma i okus voćnog soka moraju biti karakteristični za voće od kojeg je sok proizveden. Aroma, pulpa i čestice voćnog tkiva koji su bili izdvojeni tijekom prerade mogu biti vraćeni tom soku (Pravilnik o voćnim sokovima i nektarima te njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju, NN 2009/02).

Prema veličini i topljivosti čestica voćni sokovi se dijele na bistre, mutne i kašaste. Ovisno o vrsti soka primjenjuje se i odgovarajuća tehnologija proizvodnje. Postupak izdvajanja soka iz čestica voćnog tkiva, također, se razlikuje ovisno koji se sok proizvodi. U proizvodnji bistrog soka, sok se iz voćnog tkiva izdvaja prešanjem. Prešanjem se pod velikim pritiskom kroz porozni materijal (sintetski polimerni materijal ili gruba tkanina) finog poroziteta istiskuje sok iz tkiva. Time u sok ne prelaze veće čestice i krupne netopljive čestice. To je važno kako bi se olakšao daljnji proces bistrenja u tijeku kojeg se iz soka uklone u potpunosti sve netopljive čestice. Zato se bistri sok ne proizvodi iz voća koje sadrži pigmente netopljive u vodi npr. iz

breskve ili nekog drugog voća koje sadrži karotenoidne pigmente netopljive u vodi, dok se mutni i kašasti sok mogu proizvoditi iz svih vrsta voća (Lovrić i Piližota, 1994.; Levaj, 2013.).

Koncentrirani voćni sok proizvodi se od voćnog soka jedne ili više vrsta voća izdvajanjem određene količine vode fizikalnim postupcima. Ako je proizvod namijenjen krajnjem potrošaču, količina izdvojene vode treba iznositi najmanje 50% (Pravilnik o voćnim sokovima i nektarima te njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju, NN 2009/02). Koncentriranje voćnih sokova ubraja se u red najosjetljivijih procesa prerade voća zbog poteškoća pri očuvanju arome i poteškoća pri koncentriranju sokova koji sadrže koloide i netopljive tvari (čestice mutnoće) (Lovrić i Piližota, 1994.). Osim uparavanja primjenjuju se i druge metode koncentriranja, poput reverzne osmoze (Couto i sur., 2011.; Ganorkar i sur., 2012.; Gurak i sur., 2010.) i koncentriranja zamrzavanjem (Sanchez i sur., 2009.).

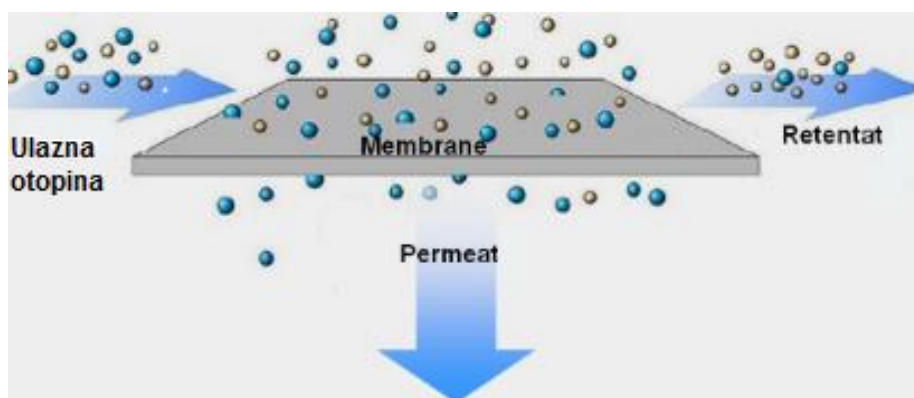
Voćni sok od koncentriranog voćnog soka proizvodi se tako da se koncentriranom voćnom soku ponovno dodaje ona količina vode koja je izdvojena tijekom koncentriranja i obnavlja aroma te, ako je to primjenjivo, pulpu i čestice voćnog tkiva izdvojene tijekom koncentriranja tog ili voćnog soka iste vrste. Dodana voda mora imati odgovarajuće karakteristike, posebice kemijska, mikrobiološka i senzorska svojstva kako bi se osigurala izvorna kakvoća soka (Pravilnik o voćnim sokovima i nektarima te njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju, NN 2009/02).

Zbog visokog udjela polifenola i znanstveno dokazane ljekovitosti (Kulling i Rawel, 2008.) plodovi aronije se nakon berbe obično prešaju i dobiveni sok samo ide na pasterizaciju. Time se dobije matični voćni sok koji mali proizvođači prodaju na tržištu. Matični voćni sok je prema definiciji (Lovrić i Piližota, 1994.) poluproizvod koji se nakon tiještenja (prešanja) konzervira pasterizacijom tj. toplinskom obradom u cijevnim ili pločastim izmjenjivačima topline na temperaturama oko 90 °C. Pasterizirani se sok nakon toplinske obrade mora ohladiti, te skladištiti u aseptičnim uvjetima u odgovarajuću ambalažu ili posebno pripremljenim cisternama. Ambalaža i cisterne moraju biti sterilne kako ne bi došlo do degradativnih promjena u matičnim soku. Temperatura u skladištima mora biti oko 10 °C ili niža (Lovrić i Piližota, 1994.).

2.3. MEMBRANSKI PROCESI

Membranski procesi su među različitim dostupnim separacijskim procesima jedna od tehnologija koja se brzo razvija i ima sve veću primjenu, posebno na područjima kemijskog inženjerstva, biotehnologije i prehrambenog inženjerstva.

Membranski procesi temelje se na primjeni polupropusnih (semipermeabilnih) membrana, određene fizičke i kemijske strukture, koje imaju selektivnu sposobnost propuštanja, odnosno zadržavanja pojedinih molekula i iona što prikazuje **Slika 1**. Membranskim procesima zajedničko je postojanje membrane kao tankog sloja koji razdvaja dvije tekuće faze (fluida) i omogućava selektivni transport tvari kroz membranu djelovanjem pogonske sile (najčešće tlaka). Međusobno se razlikuju po mehanizmima i principima same separacije, a karakterizirani su pojavom da se ulazna otopina djelovanjem tlaka potiskuje kroz membranu i razdvaja u dvije struje: permeat i retentat (koncentrat). Permeat zapravo čini skup svih prodifundiranih komponenata odnosno frakcija sastavljena od svih komponenata faze koje su prošle kroz membranu. Prolaskom kroz membranu u permeatu se smanjuje koncentracija otopljenih tvari. Retentat je skup svih komponenata neke frakcije koje nisu prošle kroz membranu, tj. dio ulazne otopine koji zaostaje na membrani i kojemu se povećava koncentracija tvari tijekom filtracije (Lovrić, 2003.; Mulder, 1996.; Herceg, 2009.)



Slika 1 Osnovni princip membranske filtracije (Schmeling i sur., 2010.)

Prednosti membranskih tehnologija su:

- kontinuirano zadržavanje,
- manje energetske potrebe ili troškovi,
- mogućnost kombiniranja s drugim separacijskim postupcima,
- zadržavanje pod blagim uvjetima,
- lakoća prenošenja u veće mjerilo,
- varijabilnost membranskih proizvoda,
- podesivost sustava i
- minimalna potreba za aditivima (Dolar, 2009.).

Membranski postupci, kao i svi procesi, imaju i svoje mane. Kao nedostaci izdvajaju se:

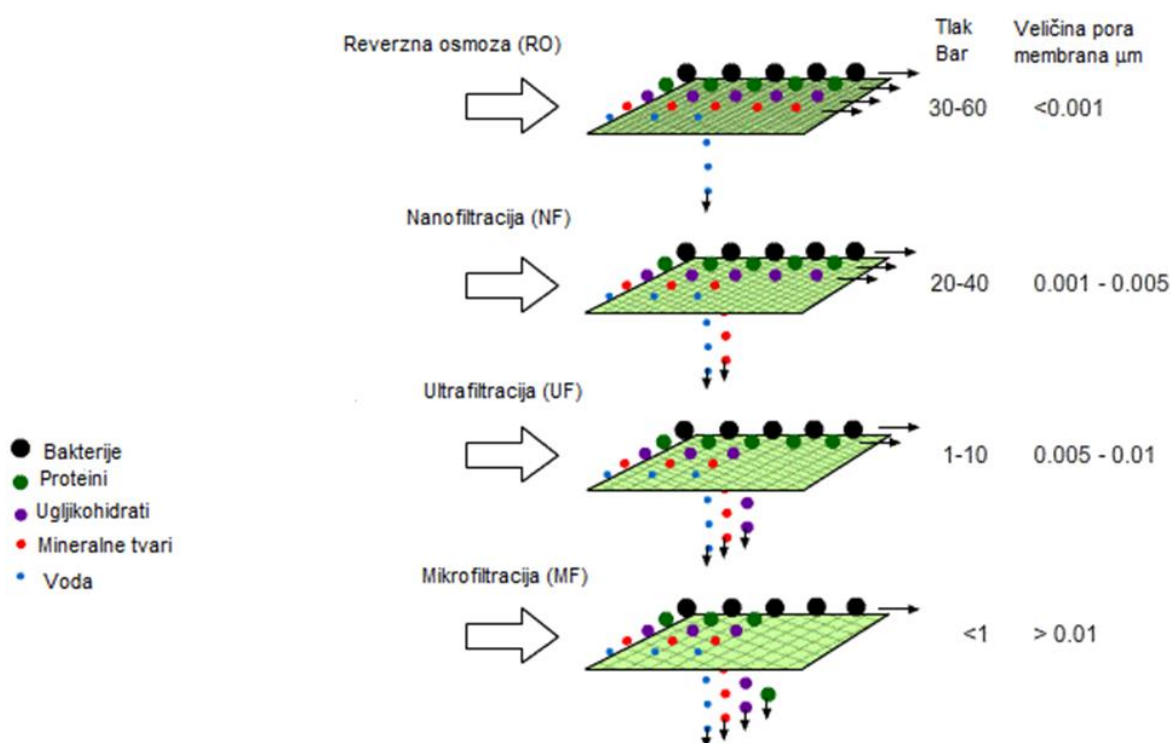
- koncentracijska polarizacija,
- membransko blokiranje,
- relativno kratki životni vijek membrana (ispod 10 godina),
- niska selektivnost ili nizak protok i
- faktor prenošenja u veće mjerilo je više-manje linearan (Dolar, 2009.).

2.3.1. Podjela membranskih procesa

S obzirom na to koji je cilj separacije, membranski procesi se mogu podijeliti na procese koji služe za:

- čišćenje: uklanjanje nepoželjnih nečistoća (npr. uklanjanje soli ili organskih tvari iz vode),
- koncentriranje: npr. koncentriranje arome voćnih sokova,
- razdjeljivanje: smjesa treba biti razdvojena u dva ili više željenih komponenti (npr. razdvajanje komponenti sirutke u tehnologiji mlijeka) i
- posredovanje pri reakciji: provođenje kemijske ili biokemijske reakcije s kontinuiranim odvođenjem produkta kroz membranu, da bi se povećala brzina reakcije (npr. membranski bioreaktor za obradu otpadnih voda) (Mulder, 1996.).

Od membranskih separacijskih postupaka najveću praktičnu primjenu imaju tlačni membranski postupci: mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), nanofiltracija (NF) i reverzna osmoza (RO). Osnovna razlika između ovih postupaka je vrsta upotrijebljenih membrana (odnosno njihova veličina pora) i tlak koji je potrebno primijeniti da bi došlo do uspješnog razdvajanja komponenti u nekom sustavu. Za navedene membranske separacijske postupke veličina pora pada od mikrofiltracije do reverzne osmoze što prikazuje **Slika 2**, a time raste radni tlak budući da je hidrodinamički otpor sve veći.



Slika 2 Tlačni membranski procesi (Web 1)

Nanofiltracija

Nanofiltracija je membranski proces kod kojeg se na membrani zadržavaju, pored većih molekula i manje molekule kao što su neke anorganske soli i manje organske molekule kao što su šećeri (monosaharidi i disaharidi). Po svojim svojstvima NF je proces između ultrafiltracije i reverzne osmoze. Prednost NF u odnosu na RO je manja potrošnja energije u procesu za 21% (Warczok i sur., 2004.). Princip separacije kod NF i RO je isti, a razlikuju se u veličini pora membrana i veličini molekula koje se zadržavaju na membrani. Veličina pora

membrana za NF kreće se oko 1 nm (10^{-3} - 10^{-2} μm). NF membrane imaju veće pore i veću propusnost od membrana za RO, pa je potrebno primijeniti manji procesni tlak. Potrebni tlak kod NF je od 10 do 40 bara, a princip separacije je otapanje i difuzija. NF membrane za razliku od RO propuštaju manje anorganske i organske molekule (soli, organske kiseline i dr.) pa permeat nije čista voda kao kod RO. NF se najviše primjenjuje u obradi površinskih voda i bunarskih voda s visokim udjelom otopljenih minerala (CaCO_3 , Mg^{2+} , Na^+ , K^+), pročišćavanje i djelomičnu demineralizaciju vode (Schaep i sur., 1998.) i za koncentriranje otopina kiselina i šećera (voćni sokovi, otopine šećera i drugo).

Vrste membrana

U tehnološkom smislu membrane predstavljaju selektivnu barijeru koja zbog svojih svojstava omogućuje razdvajanje pojedinih sastojaka bez ikakvih kemijskih promjena na njima. Općenito, membrane se mogu podijeliti na biološke (stanične membrane) i sintetičke membrane. Sintetičke membrane se mogu podijeliti u nekoliko skupina s obzirom na mehanizam separacije, kemijski sastav, fizičku strukturu i geometrijski oblik (Mulder, 1997.; Osada i Nakagawa, 1992.).

S obzirom na strukturu membrane mogu biti:

- *homogene* (izgrađene od jedne vrste materijala) i
- *heterogene* (od više vrsta materijala).

Prema fizičkoj strukturi membrane se dijele na:

- *simetrične (homogene)* – debljine oko 10 – 200 μm (smanjenjem debljine povećava se permeabilnost membrane), koje se prema strukturi dalje dijele na:
 - porozne membrane – imaju dovoljno velike pore u odnosu na molekule polimera pa se transport kroz membranu odvija kroz pore membrane bez obzira na pogonsku silu i
 - neporozne membrane – ne sadrže pore mikroskopskih dimenzija pa se transport odvija između lanaca makromolekula tvari membrane.
- *asimetrične* – po poprečnom presjeku nemaju jednaku strukturu i istu permeabilnost. Sastoje od tankog gustog sloja na površini membrane debljine od 0,1 do 0,5 μm koji se nalazi na znatno poroznijem nosaču. Porozni sloj (nosač) debljine je od 50 do 150 μm . Tanki gusti sloj i porozni sloj (nosač) su izrađeni od istog materijala (polimera).

- *kompozitne* – asimetrične membrane, sastoje se od tankog gustog sloja na površini membrane i poroznog sloja kao nosača. Debljina slojeva je ista kao kod asimetričnih membrana, ali su tanki gusti sloj i porozni sloj izrađeni od različitih materijala (polimera).

Prema mehanizmu separacije membrane se dijele na:

- *porozne* – separacija se temelji na principu razlike u veličini pora i molekula odnosno čestica (efekt sita). Primjenjuju se kod MF, UF i NF. Prema veličini pora dijele se na:
 - makroporozne – veličina pora veća od 50 nm,
 - porozne – veličina pora od 2 do 50 nm i
 - mikroporozne – veličina pora manja od 2 nm.
- *neporozne* – mehanizam separacije se temelji na različitoj topljivosti i različitoj brzini difuzije kroz membranu. Membrane za RO su ovoga tipa membrana (Mulder, 1997.).
- *membrane s ionskom izmjenom* – specifični tip neporoznih membrana, imaju fiksirane pozitivne ili negativne grupe. Postoje kationske i anionske membrane. Kationske membrane imaju fiksirane negativne grupe. Anionske membrane imaju fiksirane pozitivne grupe. Obično se koriste za elektrodijalizu pri desalinizaciji morske vode, obradi otpadnih voda iz industrije itd. (Davis, 1990.).

S obzirom na kemijski sastav membrane mogu biti:

- *organske membrane* – napravljene od organskih polimera i
- *anorganske membrane* – izrađene od keramike, metala i stakla.

Prema geometrijskom obliku membrane se mogu podijeliti na:

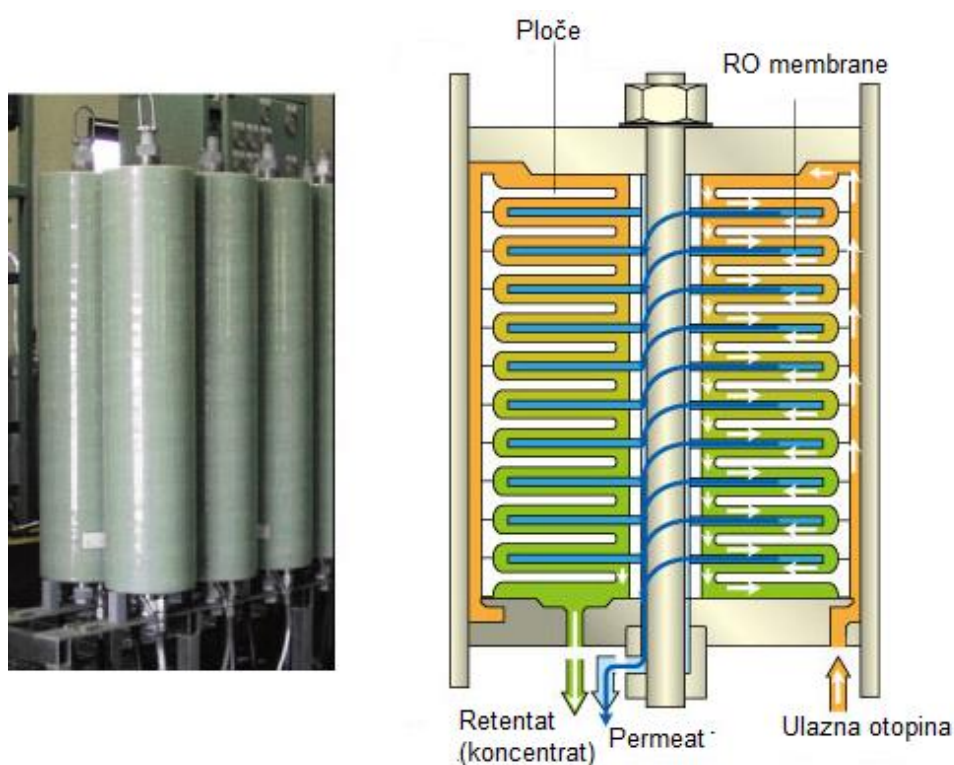
- *ravne (planarne) membrane* – u obliku ravnih, tankih folija s potpornim poroznim nosačem, mogu biti izvedene kao pločaste i spiralno namotane,
- *cijevne membrane* – u obliku cijevi promjera većeg od 3 mm, izrađuju se kao višekanalne cijevi od polimernih materijala, keramike, metala i stakla,
- *kapilarne membrane* – u obliku kapilarnih cjevčica, promjera od nekoliko mm do nekoliko μm i
- *membrane u obliku šupljih vlakana* – u obliku poroznih niti, promjera kao i kapilarne membrane (Mulder, 1997.; Pabby i sur., 2009.).

Materijali za membrane

Većina MF, UF, NF i RO membrana su sintetički organski polimeri. Različita kemijska svojstva membrana uzrokovana su različitim vrstama materijala od kojega su iste načinjene. U praksi se često koriste membrane načinjene od organskih materijala i to od različitih polimera, celuloze i njezinih derivata te aromatskih poliamida, a takve membrane karakteriziraju hidrofilni karakter, izvrsna permselektivna svojstva, bolja termička i kemijska svojstva i bolja hidrolitička stabilnost od celuloznih estera, jaka osjetljivost na klor i oksidativnu degradaciju (Mulder, 1996.).

Pločasti moduli za filtraciju

Pločasti moduli na **Slici 3** su prvi dizajnirani moduli za membranske procese i imaju najdužu primjenu u prehrambenoj industriji (Mulder, 1996.; Baker, 2004.). Njihova osnovna karakteristika je da se membrane u vidu tankih listova nalaze između sustava paralelnih ploča manjih ili većih dimenzija različitog geometrijskog oblika (krug ili kvadrat).



Slika 3 Pločasti modul (Web 2)

Modul se sastoji od naizmjenično postavljenih razdjelnih ploča, nosećih ploča i membrana smještenih na jednu vertikalnu ili horizontalnu centralnu osovinu. Membrane se nalaze s obje strane noseće ploče čija je površina isprepletena žljebovima koji stvaraju kanale kroz koje permeat protječe u unutrašnjost ploče. Promjer kanala je manji od 1 mm, te je osigurano laminarno tečenje tijekom filtracije. Razdjelna ploča se nalazi između dvije noseće ploče, na njoj površini su rebrasti izvodi i na periferiji otvori za tečenje retentata (Moslavac, 2003.; Mulder, 1996.).

Ovi moduli ne mogu podnosti jako visoke tlakove i njihova ukupna aktivna površina ($400 - 800 \text{ m}^2/\text{m}^3$) je znatno manja od kapilarnih ili spiralnih modula (Berk, 2013.). Mogu se koristiti u procesima mikrofiltracije, ultrafiltracije, reverzne osmoze, dijalize i elektrodijalize.

2.3.2. Primjena u prehrambenoj industriji

Tekuće namirnice, kao što su voćni sokovi, su vrlo značajni zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti jer su prirodno obogaćeni vitaminima i mineralima koji su važni za zdravlje čovjeka. Sirovi voćni sok izoliran iz nekog prirodnog izvora ima mali udio suhe tvari i vrlo visok udio vode. Voda, koja najvećim dijelom ulazi u sastav tekućih namirnica, doprinosi razvoju mikroorganizama. Uklanjanjem vode smanjuje se mikrobiološka aktivnost (njihov rast i razvoj) i povećava trajnost. Stoga je poželjno provesti postupak koncentriranja tekućih namirnica kako bi se povećala trajnost i stabilnost te reducirali troškovi skladištenja i transporta. Konzervirajući učinak kod koncentriranja najčešće se zasniva na osmoanabiozi (Herceg, 2009.). Tekuće namirnice su u većini slučajeva osjetljive na povišene temperature, pa koncentriranje klasičnim postupkom kao što je uparavanje dovodi do njihove degradacije. Alternativni postupci, koncentriranje zamrzavanjem i membranski procesi ograničeni su maksimalno mogućom postignutom koncentracijom. Kod koncentriranja zamrzavanjem od 45 do 55 °Brix (Sanchez i sur., 2009.), a kod membranskih procesa od 28 do 35 °Brix (Ganorkar i sur., 2012.; Jiao i sur., 2004.). Primjena membranskih procesa je također limitirana zbog pojave polarizacije koncentracije, onečišćenja membrana, te smičnog oštećenja proteina (Phillip, 1984.; Petrotos i Lazarides, 2001.).

Tri glavna područja primjene membranskih procesa u proizvodnji voćnih sokova su:

- bistenje (npr. proizvodnja voćnih pjenušavih pića – mikrofiltracija i ultrafiltracija),

- koncentriranje (npr. koncentriranje postupkom RO u proizvodnji voćnih koncentrata do 42 °Brix i više) i
- deacidifikacija (npr. smanjenje kiselosti sokova citrus voća – nanofiltracija i elektrodijaliza).

Najveća prednost membranskih procesa za koncentriranje voćnih sokova i proizvoda od povrća je manja potrošnja energije u usporedbi s klasičnim postupcima. Ekonomska prednost ovisi o energetske troškovima, troškovima zamjene membrana i samom trajanju kampanje prerade.

2.4. POLIFENOLI

Polifenolni spojevi u prirodi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključju spojeve različite kemijske strukture, od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline (hidroksicimetne kiseline) pa sve do visoko polimeriziranih tvari kao što su proantocijanidini (tanini). Polifenoli čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 8000 različitih spojeva (Harbone i sur., 2000.). Oni su produkti sekundarnog metabolizma u biljkama i nisu esencijalni za ljudski organizam.

2.4.1. Podjela polifenola

Iako se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova i mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide (Del Rio i sur., 2013.). Također jedno od njihovih karakterističnih svojstava je i povezanost s drugim molekulama, najčešće sa šećerima i proteinima. Slobodni oblici polifenolnih spojeva su uglavnom toksični, pa se oni u biljnim tkivima najčešće javljaju u vezanom obliku (Reis Giada, 2013.). Najvažniji polifenolni spojevi iz skupine flavonoida su flavonoli i antocijanini, a iz skupine neflavonoida fenolne kiseline.

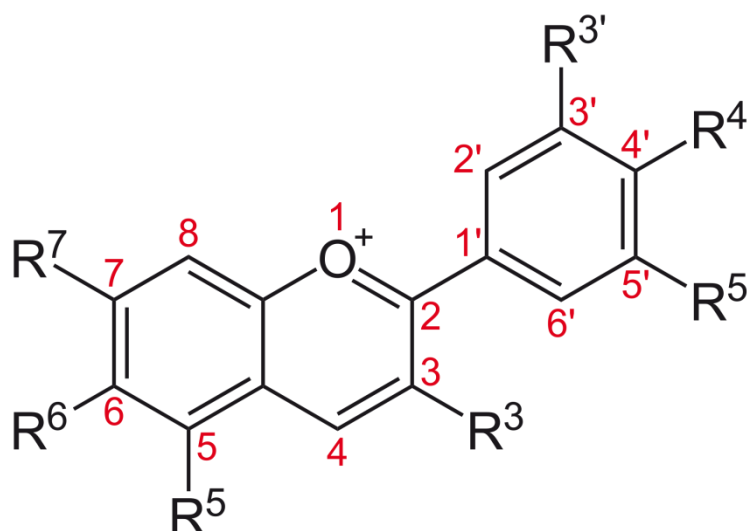
Flavonoidi

Flavonoidi (flavoni, flavonoli, katehini, antocijanini, izoflavoni i dr.) su prirodni polifenolni spojevi svugdje prisutni u biljnom svijetu: voću, povrću, cvijeću, biljnim plodovima te čaju, crvenom vinu i dr. Osnovu strukture flavonoida čini 2-fenilbenzopironski prsten, a razlikuju

se stupnjem nezasićenosti C prstena te po broju i položaju funkcionalnih skupina (hidroksilna, metoksi skupina, molekula šećera). Do sada je izolirano i opisano oko 9000 flavonoida. Njihova uloga u biljkama još nije razjašnjena, ali je poznato da je višestruka: npr. štite biljke od bolesti, privlače kukce, reguliraju rast itd. Flavonoidima se pripisuju pozitivni učinci po zdravlje čovjeka. Smatra se da se aktivnost flavonoida temelji na antioksidacijskom djelovanju i/ili inhibiciji enzima. Struktura flavonoida temelji se na flavan jezgri koja se sastoji od tri fenolna prstena (A, B i C prsten). Benzenski prsten A kondenziran je s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B. U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera što pridonosi velikoj raznolikosti i velikom broju tih spojeva. Glikozilacija se najčešće događa na poziciji C-3, ili rjeđe na poziciji C-7. Šećer koji se najčešće nalazi vezan na molekulama flavonoida je glukoza, ali glikozilacija se događa i s arabinozom, galaktozom, glukoramnozom, ramnozom i ksilozom. Ovisno o stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije prstena C, nastaju različite podgrupe flavonoida: flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli i antocijanidini (Bodiš, 2008.).

2.4.2. Antocijanini

Antocijani pripadaju flavonoidnoj grupi polifenola. Imaju $C_6C_3C_6$ kostur tipičan za flavonoide. Antocijani su glikozilirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium kationa odnosno flavilium kationa. Glavni dio antocijana je njegov aglikon, flavilium kation, koji sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za absorpciju svjetla pri valnim duljinama oko 500 nm, što omogućava pigmentu da se ljudskom oku čini crvenim. Aglikoni se nazivaju antocijanidini, a obično su penta (3,5,7,3',4') ili hekza substituirani (3,5,7,3',4',5'). Danas su poznata 22 različita antocijanidina, ali samo njih 6 je značajno za hranu. Najznačajniji antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, malvidin i petunidin. Ovi se aglikoni međusobno razlikuju po broju hidroksilnih i metoksilnih grupa na B prstenu flavilium kationa što je vidljivo na **Slici 4** (Pichler, 2011.).



Slika 4 Flavilium kation (Web 3)

2.4.3. Antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva

Polifenolnim spojevima se pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, antialergijsko, antimutageno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje. U samim biljkama polifenoli djeluju kao antimikrobni spojevi, kao fotoreceptori te kao agensi za zaštitu od UV zračenja. Zaštitna uloga polifenola u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala što se još naziva i antiradikalna aktivnost. No osim ove aktivnosti polifenoli pokazuju sposobnost kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza. To mnogostruko djelovanje vjerojatno je odgovorno za ukupnu učinkovitost tih spojeva, a zajedno se naziva antioksidacijska aktivnost. Može se reći da su antioksidansi tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala, tj. sprječavaju oksidaciju oksidabilnih spojeva. To su spojevi koji inhibiraju ili odgađaju oksidaciju supstrata kada su prisutni u koncentraciji manjoj od supstrata. Oni neutraliziraju slobodne radikale dajući im svoj elektron ili inhibiraju stvaranje slobodnih radikala. Antioksidansi imaju svojstva koja im dozvoljavaju da djeluju kao reducirajuće sredstvo. Imaju sposobnost stabilizirati ili deaktivirati slobodne radikale tako što doniraju elektron, a sami ne postaju slobodni radikali jer su stabilni. Da bi se definirali kao antioksidansi, polifenolni spojevi moraju ispunjavati dva uvjeta:

- antioksidans (polifenol) mora biti prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, ali usprkos maloj koncentraciji trebao bi bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije,
- iz polifenola nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju (Krivak, 2010.).

2.5. AROMA

Aroma je karakteristično svojstvo hrane. Ukupna aroma hrane je rezultat interakcije svih spojeva od kojih je određena hrana sastavljena. Aromatični spojevi su spojevi različitog kemijskog sastava: alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, kiseline, laktoni, eterična ulja, terpeni i različiti heterociklični spojevi (El Hadi i sur., 2013.).

2.5.1. Tvari arome voća

Aroma je također jedno od značajnih karakteristika voća, a aromatični hlapljivi spojevi imaju glavnu ulogu u određivanju percepcije i prihvatljivosti voća od strane potrošača. Upravo stoga je i identifikacija najznačajnijih hlapljivih aromatičnih spojeva koji su nosioci karakteristične arome pojedinog voća vrlo značajna i daje uvid u tzv. „senzorski identitet voća“ (Cheong i sur., 2010.).

2.5.2. Aroma aronije

Plodovi aronije posjeduju tipičnu, no ne i vrlo ugodnu aromu. Unatoč visokom sadržaju antioksidanasa zbog gorko-bademastog mirisa i oporog okusa plodovi aronije se rijetko koriste u svježem obliku i obično se procesiraju u različite proizvode kao što su sokovi, džemovi, vino i gazirana pića (Kulling i Rawel, 2008.; Balcerek, 2010.). Amigdalín, cijanogeni glikozid izoliran iz bobica aronije je odgovoran za gorko-bademast miris svježih bobica. Njegovom hidrolizom, uz pomoć topline ili endogenih enzima prisutnih u bobicama, može se osloboditi cijanovodik koji je vrlo otrovan (Kulling i Rawel, 2008.). Aronija sadrži manje količine amigdalina, pronađeno je 20,1 mg/100g FW u bobicama i 5,7 mg/100g u soku (Ara, 2002.).

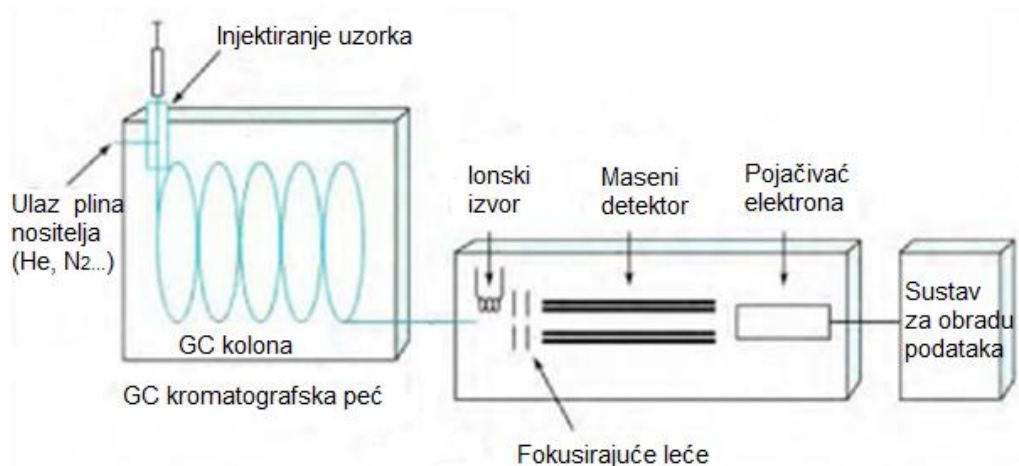
2.6. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija koristi se za odvajanje, kvantitativnu analizu i izolaciju komponenata smjese, za utvrđivanje čistoće tvari te pomoć pri identifikaciji. U plinskoj kromatografiji inertni plin nositelj (mobilna faza) eluira sastojke smjese iz kolone ispunjene stacionarnom fazom. Za razliku od tekućinske kromatografije u plinskoj kromatografiji analit ne reagira s mobilnom fazom, zbog toga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi o kemijskoj strukturi mobilne faze. Pri ulasku smjese komponenti u kolonu, ona se trenutno razdjeljuje između stacionarne i mobilne faze. Razdvajanje smjese hlapljivih sastojaka odvija se naizmjenično adsorpcijom i desorpcijom lakše hlapljivih sastojaka pod djelovanjem plina nositelja koji odnosi komponente kroz kolonu (Skoog i sur., 1999.).

Plinskom kromatografijom može se postići kvalitativna i kvantitativna analiza smjese uz bolje razlučivanje i u kraćem vremenu nego većinom danas uvedenih analitičkih postupaka (Skoog i sur., 1999.; Luterotti, 2014.).

Poznate su tri kromatografske tehnike odjeljivanja: frontalna, istiskivanje i eluiranje (ispiranje), koje se mogu primijeniti kod oba načina odvajanja komponenata smjese. Eluiranje je glavna tehnika plinske kromatografije zato što se kolona kontinuirano regenerira s inertnim plinom nositeljem. Određena količina ispitivane smjese uvodi se strujom inertnog plina u kromatografsku kolonu. Prolaskom kroz kolonu, smjesa se razdjeljuje između stacionarne faze i struje plina nositelja (pokretna faza). Plin nositelj ispire iz kolone pojedine frakcije, sastojci su na taj način pomiješani samo s plinom nositeljem te je stoga olakšano kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata (Pichler, 2011.).

Plinsko kromatografski sustavi razlikuju se po tipu plina nosača, sustavu injektiranja, kolonama i detektorima. Na **Slici 5** dan je shematski prikaz plinskog kromatografa s masenim detektorom (GCMS).



Slika 5 Shematski prikaz plinskog kromatografa s masenim detektorom (Yusof i sur., 2015.)

Plin nositelj

Kao plin nositelj koriste se kemijski inertni plinovi. Najčešće su to vodik, dušik, helij i argon. Plin mora biti inertan i ne smije reagirati s uzorkom ili punilom u koloni. Vrlo je važno da plin nositelj bude suh i pročišćen od nečistoća koje bi mogle dovesti do lošeg funkcioniranja uređaja, povećati razinu smetnji i kontaminaciju detektora, stoga se često posebno instaliraju uređaji za pročišćavanje plina (Higson, 2004; Pichler, 2011.).

Detektori

Sastojci smjese, koji su odjeljeni na kromatografskoj koloni i izneseni plinom nositeljem, moraju se na neki način registrirati odnosno detektirati. Uređaj za detekciju mora pokazati brz odziv na male promjene koncentracije sastojaka tijekom njihove elucije iz kolone. Neki od najvažnijih vrsta detektora u plinskoj kromatografiji su:

- plamenoionizacijski detektor (engl. Flame Ionization Detector, FID) – jedan od najčešće korištenih GC-detektora čiji je najveći nedostatak činjenica da razara uzorak,
- maseni spektrometar (engl. Mass Spectrophotometer, MS),
- detektor toplinske vodljivosti (engl. Thermal Conductivity Detector, TCD),
- plamenofotometrijski detektor (engl. Flame Photometric Detector, FPD),
- fotoionizacijski detektor (engl. Photo-ionization Detector, PID),

- detektor apsorpcije elektrona (engl. Electron Capture Deceptor, ECD) (Higson, 2004.).

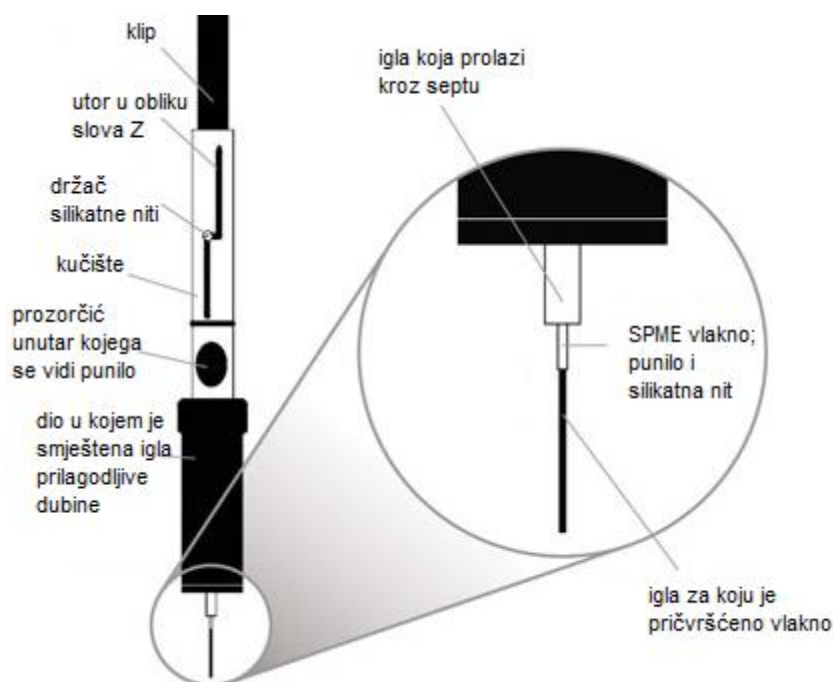
2.6.1. Masena spektrometrija

Spektrometrija masa ili masena spektrometrija (engl. mass spectrometry – MS) je analitička metoda kojom se analiziraju molekule na osnovi razlike u omjeru njihove mase i naboja (m/z). Molekule uzorka se najprije ioniziraju u ionizatoru, potom se ubrzavaju u električnom polju i uvode u odabirač brzine koji se sastoji od električnog i magnetnog polja. Analiza iona na osnovi masene razlike pruža informacije o tipu i rasporedu iona analiziranog uzorka, a za pretragu je dovoljna vrlo mala količina uzorka, svega 10 - 12 g. Stoga se ova metoda koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula i za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama.

2.6.2. SPME analize

Metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. solid phase microextraction, SPME) je jedna od novijih metoda izolacije i ekstrakcije koja je razvijena kako bi se uklonili nedostaci ekstrakcije tekućina-tekućina i ekstrakcije na čvrstoj fazi (Pawliszyn, 2009.).

Rutinski se upotrebljava zajedno s plinskom kromatografijom s masenim detektorom (GC-MS) za analizu različitih spojeva, posebno za ekstrakciju hlapljivih organskih spojeva iz različitih bioloških i prehrambenih uzoraka (Vas i Vekey, 2004.). Primjenom SPME tehnike kombinira se ekstrakcija i koncentriranje te je omogućen i direktan prijelaz adsorbiranih sastojaka u injektor plinskog kromatografa, a na taj način se sprječava ulaz kisika i vlage u kolonu plinskog kromatografa. Ovom tehnikom omogućeno je i koncentriranje sastojaka prisutnih u tragovima unutar sloja punila koje ima mali volumen, ali veliki koeficijent raspodjele sastojaka između punila i uzorka za velik broj organskih spojeva. **Slika 6** prikazuje SPME aparaturu koja se sastoji od kućišta unutar kojeg se nalazi igla. Adsorpcija sastojaka odvija se unutar igle na polimernoj stacionarnoj fazi prevučenoj preko silikatne niti dužine 1 cm. Igla štiti punilo tijekom uporabe i čuvanja, posebice prilikom prolaza kroz septum injektora plinskog kromatografa (Pichler, 2011.).



Slika 6 Shematski prikaz aparature za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (Pawliszyn, 2009.)

Punila koja se najčešće upotrebljavaju su sa slojem polidimetilsiloksana (PDMS), sa slojem poliakrilata (PA), kao i različite kombinacije PDMS/Carboxen, PDMS/DVB, Carbowax/divinilbenzen i dr. Nepolarna punila s polidimetilsiloksanom (PDMS) vrlo su djelotvorna za molekule male i srednje molekulske težine, neovisno jesu li polarne ili nepolarne te se stoga najčešće upotrebljavaju (Vas i Vekey, 2004.).

Osjetljivost SPME tehnike značajno se mijenja povećanjem koncentracije soli. Sol može utjecati na četiri različita načina na promatrane aromatične sastojke: kod većine sastojaka adsorpcija se povećava s povećanjem koncentracije soli (etil-butanoat, benzaldehid, linalool, neral), adsorpcija sastojaka se poveća na početku, a potom kod veće koncentracije soli prestaje (etil-acetat, geranial), na početku se adsorpcija poveća, a onda se povećanjem koncentracije soli smanjuje (etil-kapronat, kapronska kiselina). Adsorpcija se smanjuje povećanjem koncentracije soli (limonen) (Pichler, 2011.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Istražiti utjecaj koncentriranja nanofiltracijom na zadržavanje tvari boje i arome u soku aronije pri tlakovima od 45, 50 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Pokuse provesti na uređaju za nanofiltraciju Lab Unit 20 s membranom Alfa Laval-NF. Početni volumen je 4 L.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprema koncentriranog soka aronije

U provedenim istraživanjima korišten je matični sok aronije. Sok je pasteriziran na 85 °C kroz 10 minuta i do provedbe pokusa čuvan u staklenim bocama od 1 L u hladnjaku na temperaturi +4 °C. Početna suha tvar soka bila je 13,0%. Nakon provedenog postupka koncentriranja nanofiltracijom ispitivan je sadržaj polifenola, antocijana, antioksidacijska aktivnost te aromatični spojevi u koncentriranom soku aronije.

Pribor

1. Za proces koncentriranja soka aronije nanofiltracijom upotrijebljene su kompozitne membrane tipa Alfa Laval-NF. Kod NF membrana porozni sloj (nosač) je izrađen od poliestera. Karakteristike membrana navedene su u **Tablici 2**.

Tablica 2 Karakteristike NF membrana

Tip membrane	Alfa Laval-NF
Proizvođač	Alfa Laval Danska
R_{NaCl}	> 0,98
Maksimalna radna temperatura °C	5 – 50
Maksimalni radni tlak bar	55
Dozvoljeni pH	3 – 10

- Upotrijebljeno je šest kompozitnih membrana, složenih u pločasti modul, ukupne površine 0,1736 m² (jedna membrana ima površinu od 0,02893334 m²).

2. **Slika 7** prikazuje laboratorijski uređaj za nanofiltraciju „Lab Unit M20“ danske tvrtke Dow Danmark Separation Systems De Danske Sukkerfabrikker, Copenhagen, s pločastim modulom i membrana tipa Alfa Laval-NF.



Slika 7 Prikaz uređaja „Lab Unit M20“ (Smiljanić, 2013.)

- Pokusi su provedeni sa sokom aronije početnog udjela suhe tvari 13,0%. Početna temperatura soka u tanku kod svih pokusa je bila 0. Količina uzorka u tanku iznosila je 4 L. Koncentriranje je provedeno pri tlakovima od 45, 50 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Kod svih pokusa sok aronije koncentriran je do maksimalne koncentracije koju je bilo moguće postići, a to je 26,9% suhe tvari. Svake 4 minute bilježili smo volumen permeata, temperaturu uzorka u tanku (ukoliko se radilo o postupku s primjenom hlađenja bilježili smo i temperaturu rashladnog sredstva) i udio suhe tvari. U pokusu s hlađenjem korištena je pokretna rashladna jedinica koja je priključena na izmjenjivač topline uređaja za membransku filtraciju. Kao rashladno sredstvo koristili smo propilenglikol pomiješan sa vodom.

3.2.2. Analiza tvari boje

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra apsorpcije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenata i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001) s malom modifikacijom (Giusti i Wrolstad, 2001.). Otpipetirano je 0,2 mL ekstrakta uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 1 mL pufera pH 1, a u drugu 1 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 minuta, spektrofotometrijski je mjerena apsorbanca uzoraka pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

$$c \text{ (antocijana) (mg/kg)} = (A \times M \times FR \times 1000) / \epsilon \times l$$

gdje je: A - apsorbanca uzorka, a izračunava se prema izrazu:

$$A = (A_{512} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{512} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

$$M - 449,2$$

FR - faktor razrjeđenja

ϵ - molarna absorptivnost;

26 900 l - duljina kivete; 1 cm

(M i ϵ su uzeti za dominantnu vrstu antocijanina odnosno za cijanidin-3-glukozida).

Određivanje degradacije antocijana

Degradacija antocijana odnosno smanjenje intenziteta crvene boje (A_{512}) i povećanje posmeđivanja (A_{420}) se izračunava prema formuli:

Gustoća boje kontrolnog uzorka (tretiranog vodom):

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR$$

Boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

Boja nastala polimerizacijom = $[(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR$

FR – faktor razrjeđenja

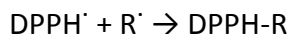
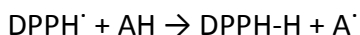
% boje nastale polimerizacijom = boja nastala polimerizacijom/gustoća boje x 100

Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva

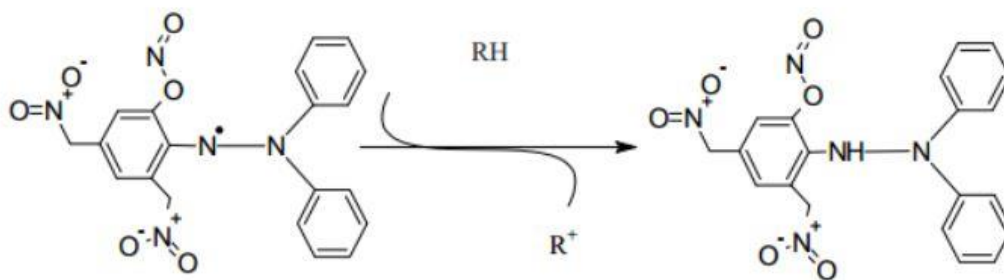
Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbance) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988.). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka soka određenog razrijeđenja, te dodano 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa (1:10; pripremljen tako da je otpipetirano 3,3 mL Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 mL i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom), te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 mL 7,5% Na_2CO_3 (ukupni volumen mora biti 20 mL). Za slijepu probu otpipetira se 2 mL destilirane vode u epruvetu, te doda 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 8 mL 7,5% Na_2CO_3 . Nakon stajanja u mračnom prostoru 2-20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj dulji od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost je određivana primjenom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensa. Uklanjanje radikala je glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u hrani. Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće, koriste 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) radikale. Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem absorbancije na 515 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa (AH) ili reakcije s radikalima (R^\cdot).



Prva reakcija na **Slici 8** s DPPH radikalima odvija se s nekom od fenolnih tvari, ali spora sekundarna reakcija može izazvati progresivno smanjenje absorbance te se ravnotežno stanje ne može postići nekoliko sati.



Slika 8 Prikaz reakcije DPPH radikala s flavonoidima (Brand-Williams i sur.,1995.)

Za određivanje antioksidativne aktivnosti primijenjena je metoda po Shimadu i sur. (1992) s malim modifikacijama (Shimada i sur., 1992.). U kivetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH. Reakcijska smjesa je ostavljena stajati 15 minuta te je absorbancija mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol.

Antioksidativna aktivnost je izračunata prema slijedećem izrazu:

$$\text{aa (\%)} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

gdje je:

A_0 - absorbancija slijepe probe

A_1 - absorbancija uzorka.

3.2.3. Analiza tvari arome

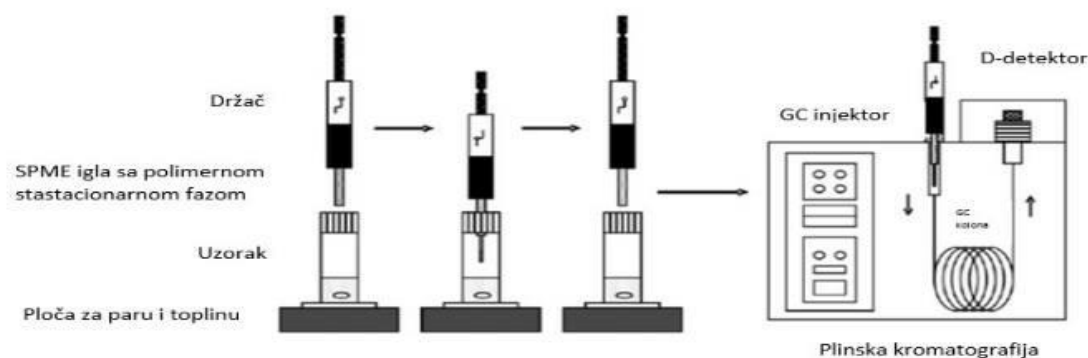
Priprema uzorka za analizu:

Prilikom pripreme uzorka korištena je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) za koju je neophodna SPME aparatura. Osnova SPME aparature je igla unutar koje se na polimernu stacionarnu fazu adsorbiraju aromatični sastojci. U radu je za pripremu uzoraka korišteno punilo od polidimetilsiloksana/divinilbenzena (polimerna stacionarna faza) debljine 65 μm .

Postupak:

U bočicu od 10 mL doda se 5 mL uzorka razrijeđenog koncentrata soka aronije (13,0% ukupne suhe tvari). Doda se 1 g NaCl radi bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. U bočicu se ubaci magnet te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u posudu s vodom te se uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, aromatični sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu (unutar igle). Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 5 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora, sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 20 minuta. Po završetku adsorpcije na **Slici 9** igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija.

Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka sora aronije provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s masenim-selektivnim detektorom Agilent 5977A.



Slika 9 Korištenje SPME holdera za uzorkovanje i analizu

Uvjeti rada plinskog kromatografa

Parametri ekstrakcije:

Temperatura ekstrakcije: 40 °C,

Vrijeme ekstrakcije: 20 minuta,

Tip mikroekstrakcije igle: 65 µm PDMS/DVB (Supelco).

GC – MS analitički uvjeti:

Kolona: CP – WAX 52 CB; 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent),

Početna temperatura: 40 °C (2 minute),

Temperaturni gradijent: 6 °C/minuta,

Plin nosač: helij (čistoće 5,0) s protokom 1 mL/minuta pri 40 °C,

Konačna temperatura: 230 °C,

Temperatura injektora: 250 °C,

Temperatura detektora: 250 °C,

Desorpcija uzorka u injektor: 5 minuta.

U izradi kromatografske analize korišten je splitless mod.

4. REZULTATI

4.1. TABLIČNI I GRAFIČKI PRIKAZI ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA

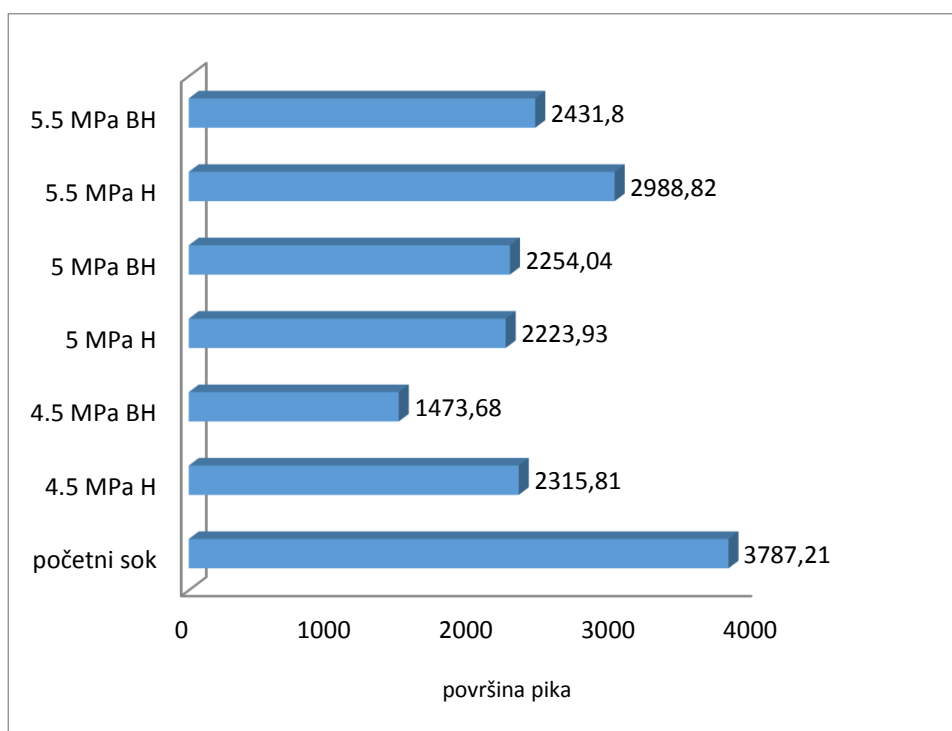
Tablica 3 Sadržaj polifenolnih spojeva u početnom soku aronije, koncentriranom soku aronije dobivenom procesom nanofiltracije pri tlaku 45, 50 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja

	Početni sok		Postupak koncentriranja nanofiltracijom					
			4,5 MPa		5,0 MPa		5,5 MPa	
			<i>H</i>	<i>BH</i>	<i>H</i>	<i>BH</i>	<i>H</i>	<i>BH</i>
Polifenoli g/L galne kiseline	4,0±0,04 ^a	Retentat	3,38±0,03 ^e	3,63±0,03 ^{cd}	3,59±0,03 ^d	3,68±0,03 ^c	3,59±0,04 ^d	3,77±0,02 ^b
		Permeat	0,08±0,01 ^a	0,08±0,003 ^b	0,05±0,004 ^e	0,07±0,004 ^c	0,06±0,003 ^d	0,05±0,004 ^d
Antocijani mg/L	369,47±0,9 ^a	Retentat	271,35±7,1 ^f	290,56±1,3 ^e	315,83±2,9 ^c	318,95±2,1 ^c	307,08±1,4 ^d	330,32±4,1 ^b
Polimerna boja %	18,7±1,4 ^e	Retentat	37,24±1,2 ^a	36,11±1,4 ^a	30,07±1,4 ^{bc}	29,7±2,2 ^{cd}	32,8±1,3 ^b	27,1±1,9 ^d
Antioksidacijska aktivnost (DPPH) mmol Trolox/L	8,2±0,01 ^a	Retentat	7,0±0,1 ^b	7,1±0,2 ^b	6,9±0,1 ^b	7,0±0,1 ^b	7,0±0,1 ^b	7,1±0,2 ^b
		Permeat	0,6±0,1 ^{ab}	0,6±0,1 ^a	0,5±0,1 ^{ab}	0,5±0,1 ^{ab}	0,5±0,1 ^{ab}	0,4±0,1 ^b

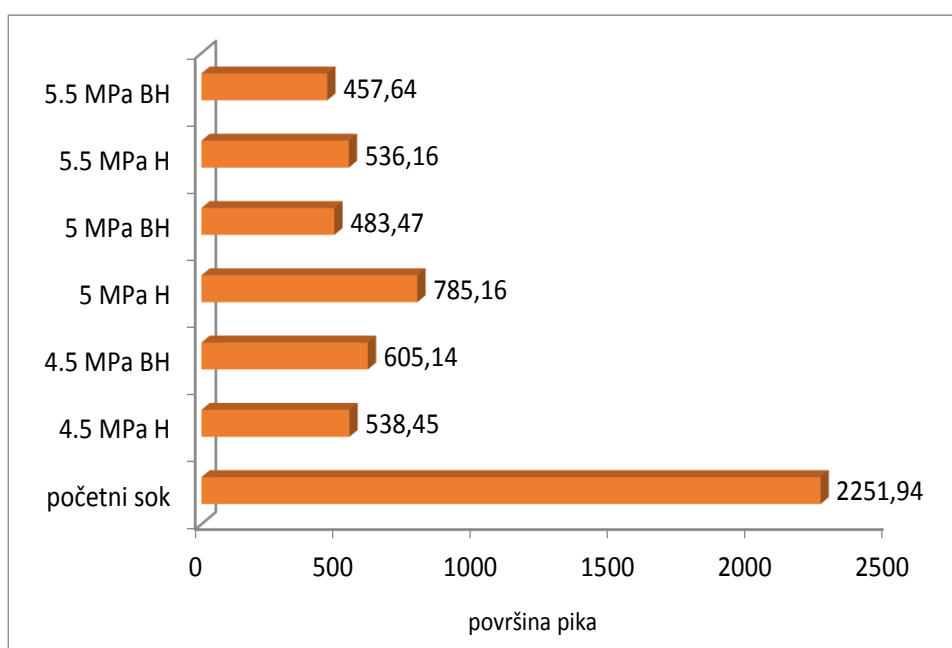
Tablica 4 Hlapive komponente identificirane u početnom soku aronije te retentatima i permeatima dobivenim koncentriranjem nanofiltracijom

Hlapive komponente	Rt*[min]
<i>alkoholi</i>	
izoamil alkohol (3-metil-1butanol)	13,54
3-heksenol	17,79
2-heksenol	18,25
2-etilheksanol	20,04
benzen metanol	27,95
benzen etanol	28,58
<i>kiseline</i>	
heksanska kiselina	27,34
oktanska kiselina	30,94
nonanska kiselina	32,62
dekanska kiselina	34,23
dodekanska kiselina	37,97
<i>esteri</i>	
n-heksil acetat	15,17
etiloktanoat	18,89
<i>terpenoidi</i>	
dl limonen	13,34
1,8-cinol	13,73
p-cimen	15,27
linalol oksid	19,16
geraniol	27,12
<i>karbonilni spojevi</i>	
2-heksenal	14,03
6-metil-5-hepten-2-on	16,78
nonanal	18,09
benzaldehyd	21,22
vitispiran	21,28
β-damascenon	26,94

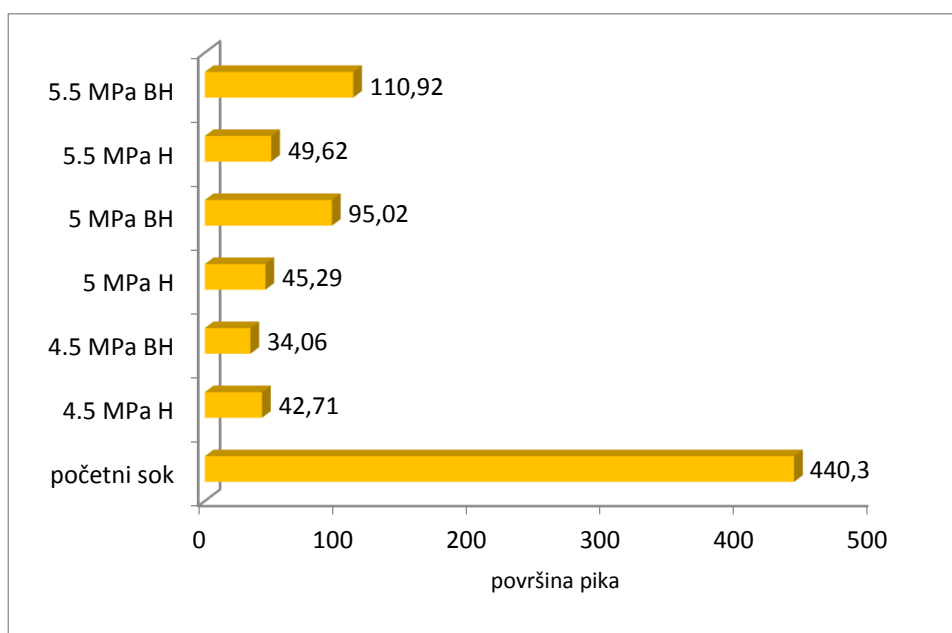
* vrijeme zadržavanja aromatičnih sastojaka (retencijsko vrijeme)



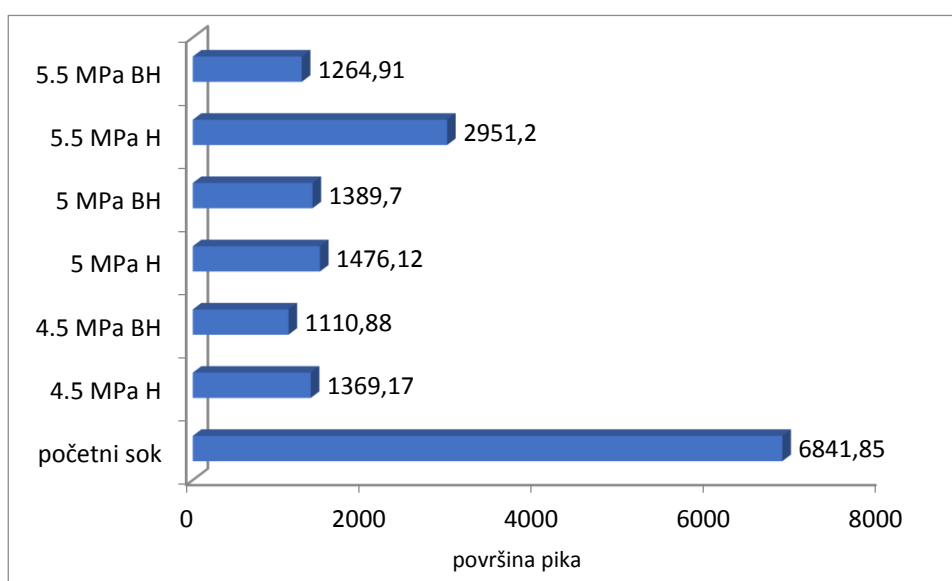
Slika 10 Zadržavanje alkohola u početnom soku aronije i koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri različitim procesnim uvjetima



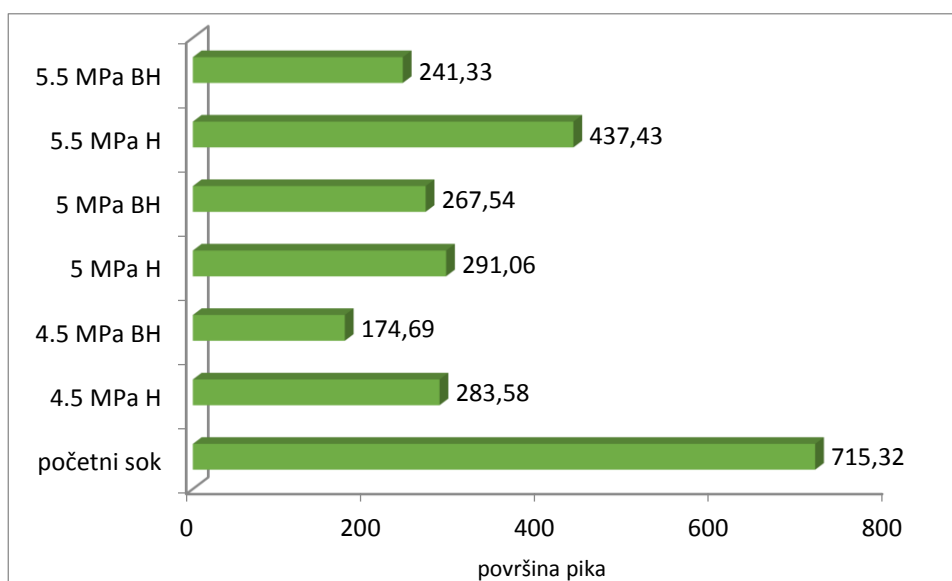
Slika 11 Zadržavanje kiselina u početnom soku aronije i koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri različitim procesnim uvjetima



Slika 12 Zadržavanje estera u početnom soku aronije i koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri različitim procesnim uvjetima



Slika 13 Zadržavanje karbonilnih spojeva u početnom soku aronije i koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri različitim procesnim uvjetima



Slika 14 Zadržavanje terpenoida u početnom soku aronije i koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri različitim procesnim uvjetima

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja utjecaja koncentriranja nanofiltracijom na zadržavanje tvari boje i arome u soku aronije prikazani su u **Tablicama 3 i 4** te na **Slikama 10-14**.

Tvari boje

U **Tablici 3** prikazana je promjena koncentracije antocijana, polimerne boje, koncentracije polifenola te antioksidativne aktivnosti u ovisnosti o primijenjenom postupku koncentriranja nanofiltracijom (s hlađenjem - H ili bez hlađenja - BH te tlaku od 4,5, 5,0 i 5,5 bara).

Rezultati pokazuju značajno smanjenje polifenola i antocijana u svim ispitivanim koncentratima. Povećanje procesnog tlaka od 4,5 MPa do 5,5 MPa dovodi do većeg zadržavanja polifenola i antocijana u koncentratima. Procesi koncentriranja bez primjene hlađenja pokazuju nešto bolje zadržavanje navedenih tvari boje.

Najbolji rezultati dobiveni su koncentriranjem pri tlaku 5,5 MPa bez hlađenja. Koncentrat dobiven tim procesom imao je 3,77 g/L polifenola, te 330,32 mg/L antocijana. To znači da je 94,3% polifenola, te 89,4% antocijana zadržano u odnosu na početni sok. Iz rezultata se može vidjeti da promjena polimerne boje slijedi trend promjene koncentracije antocijana. Veća koncentracija antocijana daje veću polimernu boju. Polimerna boja predstavlja udio boje polimeriziranog materijala koji nije nastao raspadom antocijana (Poiana i sur., 2005.). S obzirom na njihovu veliku reaktivnost, antocijani se lako prevode u bezbojne i nepoželjne smeđe obojene spojeve. Temperatura, pH, svjetlo, kisik, enzimi, askorbinska kiselina i vodikov peroksid imaju značajan utjecaj na stabilnost antocijana (Moldovan i sur., 2012.). Iz **Tablice 1** također je vidljivo da nema statistički značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti među ispitivanim koncentratima. Antioksidacijska aktivnost nešto je niža (6,9 – 7,1 mmol/L) u odnosu na početni sok aronije (8,2 mmol/L).

Mala količina polifenola (0,05 – 0,08 g/L) nađena je i u permeatu. Također je zabilježeno malo antioksidacijsko djelovanje u svim permeatima. Koncentraciju antocijana nije bilo moguće odrediti uz pomoć pH diferencijalne metode. Najveće zadržavanje polifenola zabilježeno je pri tlaku od 4,5 MPa bez hlađenja. Iz rezultata može se zaključiti da je pri većim tlakovima, bez obzira na primjenu hlađenja, degradacija polifenola izraženija u odnosu na niže primijenjene tlakove. Koncentriranje bez hlađenja trajalo je znatno kraće u odnosu na proces sa hlađenjem, tako da je degradacija i propusnost pojedinih komponenata bila manja. Također, veće zadržavanje pojedinih komponenata može se objasniti mehanizmom

difuzije, gdje povećanjem tlaka dolazi do veće adsorpcije vode, zbog jače interakcije vode i hidrofilnih membrana u odnosu na otopljene tvari povezane vodikovim vezama (Murthy i sur., 2005.).

Tvari arome

SPME, metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi, korištena je za određivanje hlapljivih komponenata u početnom soku aronije te retentatima i permeatima dobivenim koncentriranjem nanofiltracijom. Na aromatski profil, dobiven ovom tehnikom, veliki utjecaj imalo je odabrano vlakno za ekstrakciju, matriks i brzina adsorpcije tvari arome na vlakno (Sostaric i sur., 2000.). Nakon ekstrakcije, sadržaj hlapljivih komponenata određen je pomoću GC-MS tehnike.

Kao što se može vidjeti u **Tablici 4**, tijekom provedenog istraživanja identificirana su 24 hlapiva sastojka u početnom soku aronije i koncentratu dobivenom nanofiltracijom. Identificirani hlapivi spojevi podijeljeni su u pet skupina: alkoholi, kiseline, esteri, karbonilni spojevi i terpenoidi. Većina njih poznata je i karakteristična za aroniju.

Najveći dio svih aromatičnih sastojaka prisutan je u početnom soku aronije, dok je u koncentratima dobivenim postupkom nanofiltracije pri različitim tlakovima i temperaturnom režimu došlo do većih ili manjih gubitaka aromatičnih sastojaka (**Slike 10-14**).

U početnom soku aronije i koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri različitim procesnim parametrima zadržano je 48,6% karbonilnih spojeva, 26,2% alkohola, 16,0% kiselina, 6,5% terpenoida i 2,6% estera. Analizirani koncentрати sadržavali su od 42,9-53,9% alkohola, 28,2-32,7% karbonilnih spojeva, 7,7-17,8% kiselina, 5,1-6,3% terpenoida i 0,7-2,5% estera. Proces koncentriranja sa hlađenjem zadržali su više hlapivih spojeva od onih bez hlađenja pri istim tlakovima. Također, nešto bolje zadržavanje dobiveno je pri većim tlakovima. Najveće zadržavanje alkohola, karbonilnih spojeva i terpenoida imao je koncentrat dobiven primjenom tlaka od 5,5 MPa uz hlađenje. Tim procesom zadržano je 78,9% alkohola, 23,8% kiselina, 11,3% estera, 43,1% karbonilnih spojeva i 61,2% terpenoida u odnosu na početni sok aronije. Na taj način zadržano je 49,6% aromatskih spojeva u koncentratu soka aronije.

Alkoholi

Iz skupine alkohola u radu je ispitivano djelovanje na izoamil alkohol, 3-heksenol, 2-heksenol, 2-etilheksanol, benzen metanol te benzen etanol. Navedeni sastojci zadržani su u svim koncentratima soka aronije. Na Slici 10 prikazano je zadržavanje alkohola u početnom soku aronije te u koncentratima dobivenim nanofiltracijom. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 3787,21 (najviše alkohola) u početnom soku aronije pa do 1473,68 (najmanje alkohola) u koncentratu dobivenom promjenom tlaka od 4,5 MPa- BH (izraženo u površinama pikova).

Kiseline

U **Tablici 4** može se vidjeti da su u koncentratima identificirane heksanska, oktanska, nonanska, dekanska kiselina i dodekanska kiselina. Heksanska kiselina doprinosi nepoželjnoj aromi voća (Ulrich, 1997.). Određena je u vrlo maloj količini u početnom soku kao i u dobivenim koncentratima.

Općenito, sadržaj kiselina u svim koncentratima značajno je manji u odnosu na početni sok aronije (**Slika 11**). Primjena visokog tlaka, kao i temperaturnog režima, podjednako utječe na smanjenje sadržaja kiselina u odnosu na početni sok aronije (**Slika 11**).

U dobivenim koncentratima, najmanji utjecaj na smanjenje sadržaja kiselina imala je primjena tlaka od 50 bara uz hlađenje. Primjena tlakova (4,5 MPa - H i BH, 5,0 MPa - BH, 5,5 MPa - H) imaju nešto veći utjecaj na smanjenje sadržaja kiselina, dok najveći utjecaj ima tlak od 5,5 MPa - BH (**Slika 11**).

Esteri

Iz skupine estera u radu su zadržani n-heksil acetat i etiloktanoat. Na **Slici 12** prikazano je zadržavanje estera u početnom soku aronije te u koncentratima dobivenim nanofiltracijom. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 440,3 (najviše estera) u početnom soku aronije pa do 34,06 (najmanje estera) u koncentratu dobivenom promjenom tlaka od 4,5 MPa - BH (izraženo u površinama pikova).

Karbonilni spojevi

Iz skupine karbonilnih spojeva u radu je ispitivano djelovanje na 2-heksenal, 6-metil-5-hepten-2-on, nonanal, benzaldehid, vitispiran i β -damascenon. Navedeni sastojci zadržani su u svim koncentratima soka aronije. Na **Slici 13** prikazano je zadržavanje karbonilnih spojeva u

početnom soku, te u dobivenim koncentratima. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 6841,85 u početnom soku aronije pa do 1110,88 (najmanje zadržavanje) u koncentratu pri tlaku od 4,5 MPa - BH (izraženo u površinama pikova). U literaturi se često svjež, zelena mirisna voćna nota vezuje uz prisustvo karbonilnih sastojaka (Fischer i Hammerschmidt, 1992; Mallowicki i sur., 2008a). Toplinskom obradom ili smrzavanjem dolazi do smanjenja udjela tih sastojaka pa su zamjetne razlike u aromi u odnosu na svježe voće (Douillard i Guichard, 1990; Schieberle, 1994.). Karbonilni sastojci su u približno istom sadržaju zadržani u svim koncentratima, osim u koncentratu pri tlaku od 5,5 MPa - H (**Slika 13**).

Terpenoidi

Od terpenoida u radu je određivano zadržavanje dl limonena, 1,8-cinola, p-cimena, linalol oksida i geraniola.

Na **Slici 14** prikazani su rezultati sadržaja odabranih terpenoida u početnom soku kao i u dobivenim koncentratima. Iz rezultata na **Slici 14** vidi se da koncentriranjem dolazi do smanjenja sadržaja terpenoida u odnosu na početni sok aronije.

Najveći utjecaj na zadržavanje sadržaja terpenoida u koncentratu imao je tlak od 5,5 MPa - H.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- koncentriranje voćnih sokova uparavanjem uzrokuje veliki gubitak prehrambene vrijednosti i vrlo vrijednih i osjetljivih spojeva poput antocijana, pa su se membranski procesi (reverzna osmoza i nanofiltracija) pokazali dobrim izborom kao postupak predkoncentriranja
- u istraživanju ispitivana je nanofiltracija soka aronije primjenom različitih procesnih tlakova i temperaturnih režima
- odabrani procesni parametri značajno su utjecali na zadržavanje aromatičnih i fenolnih spojeva
- protok permeata bio je najveći pri tlaku od 5,5 MPa bez hlađenja retentata, uz napomenu da je proces bio znatno kraći od ostalih
- navedenim procesom dobiven je koncentrat sa najvećom zadržanom količinom fenolnih spojeva
- gubitak arome dogodio se u svim koncentratima, ali je najmanji bio pri tlaku od 5,5 MPa uz hlađenje
- nanofiltracija kao membranska filtracija može se uspješno primijeniti za koncentriranje soka aronije do određenog udjela suhe tvari i na taj način djelomično zamijeniti konvencionalan proces uparavanja

7. LITERATURA

- Ara V: Schwarzfruchtige *Aronia*: Gesund – und bald "in aller Munde"? *Flüssiges Obst* 10: 653-658, 2002.
- Balcerek M: Carbonyl compounds in aronia spirits. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 60(3): 243–249, 2010.
- Berk Z: *Food Process Engineering and Technology*, Academic Press, London, 2013.
- Borowska EJ, Szajdek A, Czaplicki S: Effect of heat and enzyme treatment on yield, phenolic content and antioxidant capacity of juices from chokeberry mash. *Italian Journal of Food Science* 21(2): 1-14, 2009.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30, 1995.
- Campbell CS, Evans RS, Morgan DR, Dickinson TA, Arsenault MP: Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the *Maloideae*, *Rosaceae*): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Systematics and Evolution* 266: 119–145, 2007.
- Cheong KW, Tan CP, Mirhosseini H, Hamid NSA, Osman A, Basri M: Equilibrium headspace analysis of volatile flavour compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid phase microextraction. *Food Res. Int.* 43: 1267–1276, 2010.
- Couto DS, Cabral LCM, Matta VM, Deliza R, Castro Freitas DG: Concentration of pineapple juice by reverse osmosis: physicochemical characteristics and consumer acceptance. *Food Science and Technology (Campinas)* 31: 905-910, 2011.
- Couto DS, Cabral LMC, Matta VM, Deliza R, Freitas D G C: Concentration of pineapple juice by reverse osmosis: physicochemical characteristics and consumer acceptance. *Food Science and Technology (Campinas)* 31(4), 2011.
- Davis TS: "Electrodialysis". *Handbook of Industrial Membrane Technology* 1: 40–102, 1990.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Massimiliano Tognolini, Gina Borges, and Alan Crozier: Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 18: 1818–1892, 2013.
- Dolar D: Utjecaj poroznosti i ostalih karakteristika NF/RO membrana na njihovu separacijsku djelotvornost pri obradi voda. *Doktorski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Douillard C, Guichard E: The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): characterisation of some cultivars and influence of freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 50: 517-531, 1990.
- El Hadi, M.A.M., Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J: Advances in Fruit Aroma Volatile Research. *Molecules* 18: 8200-8229, 2013.
- Fischer N, Hammerschmidt FJ: A contribution to the analysis of fresh strawberry flavour. *Technologie und Chemie der Lebensmittel* 14: 141-148.

- Ganorkar P, Nandane A, & Tapre A: Reverse osmosis for fruit juice concentration – a review. *Research & Reviews: Journal of Food Science and Technology* 1(1): 23–36, 2012.
- Gurak PD, Cabral LMC, Rocha-Leao MHM, Matta VM, Freitas SP: Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering* 96: 421–426, 2010.
- Harbone JB, Williams C: Advances in Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504, 2000.
- Hardin JW: The enigmatic chokeberries (*Aronia*, *Rosaceae*). *Torreya* 100: 178–184, 1973.
- Herceg Z: *Procesi konzerviranja hrane : novi postupci*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.
- Higson S: *Analytical Chemistry*. OXFORD University Press, 2004.
- Jeppsson N: The effect of cultivar and cracking on the fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and the hybrids between chokeberry and rowan (*Soubzis*). *Gartenbauwissenschaft* 65: 93-98, 2000.
- Jiao B, Cassano A, Drioli E: Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices. *Journal of Food Engineering* 63: 303–324, 2004.
- Kalkman C: Rosaceae. In *The families and genera of vascular plants*. Edited by K. Kubitzki. Springer, str. 343–386, Berlin, 2004.
- Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 74: 1625–1634, 2008.
- Levaj Branka: *Tehnologija voća i povrća*, II dio, Zagreb, 2013.
- Lovrić T, Piližota V: *Konzerviranje i prerada voća i povrća*, Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1994.
- Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 2003.
- Luterotti S: *Uvod u kemijsku analizu, sedmo izdanje*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2014.
- Malowicki SMM, Martin R, Qian MC: Comparison of sugar, acids, and volatile composition in raspberry bushy dwarf virus-resistant transgenic raspberries and the wild type 'Meeker' (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6648–6655, 2008a.
- Malowicki SMM, Martin R, Qian MC: Volatile composition in raspberry cultivars grown in the Pacific Northwest determined by stir bar sorptive extraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4128–4133, 2008b.
- Milić M : *Priručnik za uzgoj aronije*, Donji Miholjac, 2012.

- Moldovan B, David L, Chişbora C, Cimpoiu C: Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules* 17: 11655–11666, 2012.
- Moslavac T: Koncentriranje model otopina alkohola, estera i aldehida RO. *Doktorski rad*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2003.
- Mulder M: *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, 1996.
- Murthy G, Sridhar S, Shyam Sunde M, Shankaraiah B, Ramakrishna M: Concentration of xylose reaction liquor by nanofiltration for the production of xylitol sugar alcohol. *Separation and Purification Technology* 44: 221–228, 2005.
- Osada Y, Nakagaw T: *Membrane Science and Technology*. Marcel Dekker Inc, New York, 1992.
- Pabby AK, Rizvi SSH, Sastre AM: *Handbook of membrane separations*. Chemical, pharmaceutical, food and biotechnological applications, CRC Press, 2009.
- Pawliszyn J: *Handbook of SPME*, Chemical Industry Press, Beijing, 2009.
- Petrotos KB, Lazarides HN: Application of membrane technology to food processing. *Trends in Food Science and Technology* 4: 277-282, 2001.
- Phillip T: Purification and concentration of natural colourants by membranes. *Food Technology* 38 (12): 107-108, 1984.
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Poiana MA, Munteanu MF, Bordean DM, Gligor R, Alexa E: Assessing the effects of different pectins addition on color quality and antioxidant properties of blackberry jam. *Chemistry Central Journal* 121: 1–13, 2013.
- Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, Kerr M, Robertson KR, Arsenault M, Dickinson TA, Campbell CS: Phylogeny and classification of *Rosaceae*. *Plant Systematics and Evolution* 266: 5–43, 2007.
- Pravilnik o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju NN 2009/02
- Rehder A: Bibliography of Cultivated Trees and Shrubs. Arnold Arboretum, str. 261–262, Harvard University, 1949.
- Reis Giada ML: Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power In Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, Edited by José A. Morales-González, *InTech*, 87-112, 2013.
- Robertson KR, Phipps JB, Rohrer JR, Smith PG: A synopsis of genera in Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 16: 376–394, 1991.

- Sánchez J, Ruiz Y, Auleda J M, Hernández E, Raventós M: Freeze Concentration in the Fruit Juices Industry. *Food Science and Technology International* 15(4): 303-315, 2009.
- Schaep J, Van der Bruggen B, Uytterhoeven S, Croux R, Vandecasteele C, Wilms C, Van Houtte E, Vanlerberghe F: Removal of hardness from groundwater by nanofiltration. *Desalination* 119: 295-302, 1998.
- Schieberle P: Heat-induced changes in the most odour-active volatiles of strawberries. U *Trends in Flavour Research*. H. Maarse, D. G. Van der Heij (ur.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 345-351, 1994.
- Schmeling N, Konietzny R, Sieffert D, Rölling P, Staudt C: Functionalized copolyimide membranes for the separation of gaseous and liquid mixtures. *Beilstein J. Org. Chem* 6: 789–800, 2010.
- Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM: Effects of Aronia melanocarpa juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Medica (Plovdiv)* 44: 20-23, 2002.
- Skoczynska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, Ryszard A: Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacological Report* 59: 177-182, 2007.
- Skoog DA, West DM, Holler F J: *Osnove analitičke kemije. 1st edition*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Skupien K, Oszmianski J: The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agricultural and Food Science* 16: 46-55, 2007.
- Smolik M, Ochmian I, Smolik B: RAPD and ISSR methods used for fingerprinting selected, closely related cultivars of Aronia melanocarpa. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39(2): 276-284, 2011.
- Sostaric T, Boyce M C, Spickett E E: Analysis of the volatile compounds in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5802–5807, 2000.
- The PLANTS Database, database (version 5.1.1), 2000, National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. <http://plants.usda.gov> (02.07.2016.)
- Ulrich D, Hoberg E, Rapp A, Kecke S: Analysis of strawberry flavour-discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A* 205: 218-223, 1997.
- Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A: Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aronia melanocarpa on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 56: 195-201, 2004.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A: Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Aronia melanocarpa fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 29: 101-105, 2007.

- Vas G, Vékey K: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom* 39(3): 233-54, 2004.
- Warczok J, Ferrando M, Lopez F, Guell C: Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering* 63: 63–70, 2000.
- Web 1: <http://www.smartmembranesolutions.co.nz/membrane-classifications/> (02.07.2016)
- Web 2: http://www.kobelco-eco.co.jp/english/product/dt_module/genri.html (02.07.2016.)
- Web 3: <https://en.wikipedia.org/wiki/Anthocyanidin> (02.07.2014.)
- Wrolstad RE, Robert W, Durst and Jungmin Lee: Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology* 16: 423-428, 2005.
- Wrolstad RE: Anthocyanins u Natural Food Colorants, str. 237-252, New York: Marcel Dekker, 2010.
- Yusof UKM, Soh AC, Radzi NFM, Ishak AJ, Hassan MK, Ahmad SA, Khamis S: Selection of feature analysis electronic nose signals based on the correlation between gas sensor and herbal phytochemical. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 9(5): 360-367, 2015.